

# 菌血症の診断を目的としたDNAマイクロアレイの開発

著者	木幡 桂
号	2273
発行年	2006
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/22889">http://hdl.handle.net/10097/22889</a>

氏 名（本籍）	こ 木	はた 幡	かつら 桂
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）		
学 位 記 番 号	医 博 第 2 2 7 3 号		
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻		
学 位 論 文 題 目	菌血症の診断を目的とした DNA マイクロアレイ の開発		

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 佐々木	毅	教授 賀 来 満 夫
	教授 服 部 俊 夫	教授 八重樫 伸 生	

# 論文内容要旨

## 【目 的】

深在性の感染症や菌血症による敗血症は時に致死的な経過をとるため、早期診断および早期治療が必要とされる。診断には通常血液培養法により血液中の細菌の同定が行われるが、培養に時間がかかり、同定までに3日以上を要することもまれではない。この問題を解決するために、種々の遺伝子解析技術を用いて血液検体から病原体を同定する試みがなされている。本研究は、近年遺伝子発現研究に利用されているマイクロアレイを菌血症診断のための細菌同定検査に応用し、当院において分離頻度の高い10菌種を同定するマイクロアレイを開発することを目的とした。

## 【方 法】

各菌種の16S ribosomal RNA 遺伝子中の種特異性の高い配列を6個ずつ選んでプローブとしてマイクロアレイを作成し、検体DNAからPCRで増幅した16S ribosomal RNA 遺伝子断片とハイブリダイズさせた。定量PCRのprimerを作製し、臨床検体からの至適DNA抽出法を検討した。臨床検体の全血・血漿から抽出したDNAを用いてマイクロアレイの有用性を評価した。

## 【結 果】

細菌DNAをマイクロアレイで解析したところ、種毎に特徴的なハイブリパターンが得られた。定量PCR系を用いて臨床検体からの至適DNA抽出方法を検討した。2mlの全血より得た血漿から抽出したDNAおよび全血180 $\mu$ lから抽出したDNAを鋳型として定量PCRを行ったところ、*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* および *P. aeruginosa* を健常人血液と混合した菌血症モデル系では、すべての菌種の各菌量（1-6000 CFU/ml）の検体で血漿DNA中の細菌遺伝子量は全血DNA中の2-8倍であった。検出限界も *S. aureus* では全血DNAで150 CFU/mlであったものが、血漿DNAでは15 CFU/mlであり、他菌種でも同様であった。この基礎検討の結果から、血液培養陽性の臨床検体の血漿から抽出したDNAを用い、マイクロアレイ解析を行ったところ、71.4%に陽性所見が得られ、その同定結果は血液培養の結果と一致した。

## 【結 論】

マイクロアレイ解析は血液培養に比べ大幅に短い時間で結果を得ることが出来るため、迅速な菌血症診断が可能となる。今後対象菌種を増やすことにより、本法は臨床的に有用な検査法となり得ると考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

深在性の感染症や菌血症による敗血症は時に致死的な経過をとる。これを防止するためには、早期診断および早期治療が必要とされるが、特に、血液疾患領域では、幹細胞移植や大量化学療法の開発により、高度な免疫抑制状態が長期間持続するので、敗血症のリスクが高い。敗血症の診断では通常は血液培養法による血液中に存在する細菌の同定が行われるが、培養に時間がかかる。すなわち、菌の同定までに3日以上を要することもまれではない。重症病変では、検査成績を迅速に得ることが必要とされるので、これでは不十分であった。この問題を解決するために、本研究では、近年遺伝子発現研究に利用されているマイクロアレイ法を菌血症診断のための細菌同定検査に応用することを試みた。具体的には、10種の細菌の16S ribosomal RNA 遺伝子中の種特異性の高い配列を6個ずつ選んでプローブとして基盤に配したマイクロアレイを作製した。細菌 DNA から PCR で増幅した16S ribosomal RNA 遺伝子断片とハイブリダイズさせ特異性を確認したのち、菌種特異的定量 PCR による測定系を作成し、その定量値の裏づけを基に、マイクロアレイ解析に至適な血液検体処理法を確立した。これらの基礎的検討によって確立した方法を用いて血液培養に用いた臨床検体から抽出した DNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。その結果、71.4%で陽性所見が得られ、その同定結果は血液培養の結果と一致した。これらはマイクロアレイ解析が敗血症診断法として精度の高い方法であることを示すものである。マイクロアレイ解析は同時に多数の菌種が同定でき、しかも通常の培養法に比べ迅速性においても優れていることから、新たな敗血症診断法としてその臨床応用が期待できると考えられる。本研究において示されたマイクロアレイの臨床的有用性は、特異性の確認、検体処理の至適条件の確立といった基礎的検討に裏付けられたものであり、マイクロアレイ解析の臨床応用の十分な根拠となり得るものであろう。従って、本研究は新たな敗血症診断の開発につながる臨床的に貢献度の高い研究と考えられ、学位に値するものと判断する。